

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001915

利用 CRISPR/Cas9 系统建立斑马鱼 *Morn3* 基因敲除模型曾 婧¹, 刘 晗¹, 李 为², Hept Megan³, Lister James A³, 张 玲¹, 张志兵²

(1. 武汉科技大学医学院公共卫生学院, “职业危害识别与控制”湖北省重点实验室, 武汉 430065;

2. Department of Obstetrics & Gynecology, Wayne State University, Detroit, MI, 48201, USA;

3. Departments of Human & Molecular Genetics, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, 23298, USA.)

【摘要】目的:采用高效基因编辑系统 CRISPR/Cas9 对斑马鱼的 *Morn3* 基因进行编辑, 以期建立 *Morn3* 基因敲除斑马鱼模型。**方法:**针对斑马鱼 *Morn3* 基因用生物信息学选取靶位点, 构建 gRNA 表达载体并体外转录, 将 gRNA 和 Cas9mRNA 混合物显微注射到斑马鱼单细胞期的受精卵中, 24~48 h 提取基因组 DNA, PCR 扩增出目的片段, 限制性酶切法初步检测基因打靶情况, 最后进行测序分析确定编辑效果。**结果:**取 3 个靶位点(M1、M2、M3)进行试验, 选择 gRNA 浓度较高的 M2 和 M3 进行注射。限制性酶切及测序的结果显示 M3 已产生基因编辑效应。**结论:**本研究通过 CRISPR/Cas9 系统成功获得 *Morn3* 基因编辑的突变体, 为进一步探讨 *Morn3* 基因的作用提供研究基础。

【关键词】CRISPR/Cas9; *Morn3*; 斑马鱼; 基因编辑**【中图分类号】**R698.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-04-03*Morn3* knockout zebrafish model established by the CRISPR/Cas9 systemZeng Jing¹, Liu Han¹, Li Wei², Hept Megan³, Lister James A³, Zhang Ling¹, Zhang Zhibing²

(1. School of Public Health, Hubei Province Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan University of Science & Technology; 2. Department of Obstetrics & Gynecology, Wayne State University;

3. Departments of Human & Molecular Genetics, Virginia Commonwealth University)

【Abstract】Objective: To establish a *Morn3* knockout zebrafish model using the efficient CRISPR/Cas9 gene editing system. **Methods:** The target sites for the *Morn3* gene in zebrafish were chosen by bioinformatics analysis; the gRNA expression vector was constructed, and *in vitro* transcription was performed; then a mixture of gRNA and Cas9 mRNA was microscopically injected into the one-cell fertilized eggs of zebrafish. Genomic DNA was extracted at 24 to 48 hours post microinjection, and target fragments were amplified by PCR. Restriction enzyme digestion was used to detect gene targeting. Finally, sequencing analysis was used to determine the editing effect. **Results:** Three target sites (i.e., M1, M2, and M3) were tested, and the two sites with higher concentrations of gRNA (M2 and M3) were injected. Results from restriction enzyme digestion and DNA sequencing revealed that gene editing effect had been produced in M3. **Conclusion:** The *Morn3* knockout zebrafish model has been successfully obtained by the CRISPR/Cas9 gene editing system, which provides a basis for further study of the *Morn3* gene.

【Key words】CRISPR/Cas9; *Morn3*; zebrafish; gene editing

MORN蛋白(membrane occupation and recognition nexus repeat containing domain, MORN)最早鉴定为 junctophilin-1 中的质膜结合模块, 有报道

MORN基序蛋白在雄性生殖细胞中表达^[1]。本课题组前期研究表明 *Morn3* mRNA 仅在小鼠睾丸中丰富存在可能调节精子鞭毛发生, 且其可能与减数分裂表达基因 1 (MEIG1) 协同发挥作用^[2]。最新研究发现 MORN3 的表达与调节纤毛形成的纤毛素 (multicilin) 有关, 进一步说明 MORN3 参与纤毛形成^[3]。为了进一步研究 MORN3 在体内调节纤毛/鞭毛形成中的作用机制, 建立 *Morn3* 基因缺失表达的动物模型是关键环节。

作者介绍: 曾 婧, Email: zengjingwhu@163.com,

研究方向: 生殖健康与男性不育。

通信作者: 张志兵, Email: zhibing.zhang@vcuhealth.org。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81671514, 81571428, 81300536); 湖北省卫计委资助项目 (编号: WJ2015Q026)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181122.0902.002.html>

(2018-11-22)

CRISPR/Cas9 系统是原核生物所特有的一种抵御外源性遗传物质的免疫系统,该系统在序列特异 RNA 的介导下,能够切割并降解外源性的 DNA^[4]。CRISPR/Cas9 系统有 3 种类型,其中 II 型系统的组成最简单,应用最广。由于其突变效率高、方法简单及成本低的特点,被认为是一种具有广阔前景的基因组编辑工具。本研究采用高效基因编辑系统 CRISPR/Cas9 对斑马鱼的 *Morn3* 基因进行编辑,并对阳性突变体进行筛选,以期建立 *Morn3* 基因敲除斑马鱼模型,为进一步探讨 *Morn3* 基因对精子发生机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

实验动物为 NHGRI-1 品系斑马鱼^[5],来自弗吉利亚联邦大学人类与分子遗传学实验室,饲养在该校自动循环水养殖系统中,28.5℃恒温及光暗周期比为 14 h:10 h。取健康、性成熟的斑马鱼,雌雄按 1:1 的比例放入产卵缸内,次日拿掉挡板,让其完成产卵与受精,3~4 h 后收集受精卵,置于 28.5℃培养箱中进行孵化。胚胎发育阶段定义参照文献^[6]。

逆转录试剂盒(MEGAscript T7 Transcription kit)和 mRNA 纯化试剂盒(mirVana miRNA isolation kit)均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司,PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司,Sfc I 和 Dde I 限制性内切酶购自 New England Biolabs (NEB) 公司。PCR 引物、DNA 序列测定、DNA Marker 购自 Invitrogen 公司。微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo Scientific, 美国)。

1.2 确定待敲除基因靶位点

Crispr/Cas9 的剪切位点位于 PAM 区(protospacer-adjacent motif),即 NGG 位点之前。利用 Labun^[7]和 Montague^[8]等开发的 Chopchop 系统(<http://chopchop.cbu.uib.no/index.php>)确定待敲除基因的靶位点,取前 3 个靶位点进行试验(记为 M1、M2、M3)。靶位点包含 20 个碱基,其中 5'端为 GG,以利

于提高 T7 启动子的合成效率;紧邻靶点 3'端的 3 个碱基构成 PAM 区,其序列为 NGG(N 为任意碱基)。本实验采用限制性内切酶检测突变,因此在设计好的靶位点上还应确定有唯一的限制性内切酶的酶切位点。

1.3 gRNA 的制备及 Cas9 mRNA 的合成

PCR 产物体外转录合成 gRNA。具体步骤如下:以 T7-gRNA 骨架为模板,利用携带 T7 启动子和 gRNA 靶位序列的基因特异性上游引物和通用下游引物 gRNA-RP 扩增 gRNA 模板。反应体系共 50 μL,包括 Taq polymerase 0.75 μL,10× standard Taqbuffer 5 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,DMSO 1.5 μL,constant primer 1 μL,上下游引物各 1.25 μL,gRNA 模板 1 μL,ddH₂O 38.5 μL。反应条件:95℃ 1 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 20 s,40 个循环;72℃ 5 min。经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的分子量是否正确。PCR 产物经纯化回收后,以 MEGAscript T7 Transcription kit 试剂盒体外转录 gRNA。gRNA 经纯化回收后进行浓度测定。gRNA 原液-80℃冻存用于后续的显微注射。

Cas9 mRNA 通过 pT3TS-nCas9 质粒合成,使用 mMES-SAGE mMACHINE T3 Transcription kit 转录试剂盒体外转录 mRNA,测定 RNA 浓度。Cas9 mRNA 原液冻存于-80℃用于后续的显微注射。

1.4 斑马鱼受精卵显微注射

将 Cas9 mRNA(250~350 ng/μL)和 sgRNA(20~50 ng/μL)混匀显微注射入单细胞期野生型 NHGRI-1 品系斑马鱼受精卵中,每个受精卵注射 1 nL 混合物,同期未注射的受精卵作为对照组,每个靶基因注射 30 枚受精卵,置于 28.5℃恒温培养箱中孵化培养。

1.5 斑马鱼胚胎基因组 DNA 提取

取 24~48 hpf(hours post fertilization)经显微注射的 F0 胚胎 8 枚和对照组胚胎 2 枚,分别进行胚胎基因组 DNA 的提取。提取步骤如下:胚胎置于已预先加入 50 μL 50 mmol/L NaOH 的 PCR 管中,标记,95℃变性 10 min,加入 5 μL 1 mol/L Tris-HCl,混匀离心,取 1 μL 作为模板直接进行基因型 PCR 鉴定,突变鉴定引物序列见表 1,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测进行鉴定。

表 1 *Morn3*gRNA 模板的寡核苷酸链序列

名称	序列(5'-3')	用途
M1 gene specific oligo	TAATACGACTCACTATA gacagagggcagctgtacgaGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
M2 gene specific oligo	TAATACGACTCACTATA gctgaggacaaacatcatgGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	gRNA模板扩增
M3 gene specific oligo	TAATACGACTCACTATA gactcctgtaggcaaacctgGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	gRNA模板扩增
M1-PCR-F	CTGGAGTGATGGGAAGAAGAAC	靶位扩增
M1-PCR-R	CAAAAATATACCCCTGCACCAT	靶位扩增
M2-PCR-F	TTTCTACAGTGCATCTGCGTTT	靶位扩增
M2-PCR-R	ACATTGTGCCCAGAGACAATAA	靶位扩增
M3-PCR-F	GTACCCATATGGCTGTTTTGT	靶位扩增
M3-PCR-R	TTGATAAACCGTGTTCCTACTGC	靶位扩增

注:小写字母即为 20 bp 的靶位点碱基序列,F:正向引物,R:反向引物

1.6 酶切和测序鉴定 gRNA 敲除效果

M2 和 M3 的 PCR 产物分别用 *Dde* I 和 *Sfc* I 进行酶切, 鉴定靶位点是否已产生突变。同时将 PCR 产物通过测序确定 gRNA 敲除效果。如果测序峰图显示为单一峰, 说明没有造成斑马鱼 *Morn3* 基因突变; 如果测序峰图中靶位点之前为单一峰, 但是靶位点及之后的峰图出现双峰或套峰, 则能确定该 gRNA 有效, 已造成斑马鱼 *Morn3* 基因突变。

2 结果

2.1 gRNA 靶位点选择

在 chopchop 网站中输入基因名称“*Morn3*”, 物种名称选择“*Danio rerio*”, 方法名称选择“CRISPR/Cas9”即可, 根据敲除效率排序, 在“target sequence”中选择前 3 个作为本次基因敲除的靶位点。得到 3 条基因特异性寡核苷酸链, 详见表 1。

2.2 gRNA 的制备

针对 3 段 M1~M3 的引物, PCR 扩增后的条带大小均与预期的 120 bp 相符(图 1)。经检测 RNA 浓度分别为 M1 10.74 ng/μL, M2 19.96 ng/μL, M3 45.26 ng/μL。因 M1 段产物浓度较低, 选择浓度较高的 M2 和 M3 进行注射。

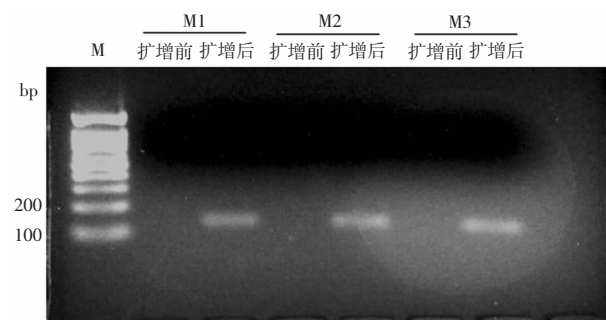
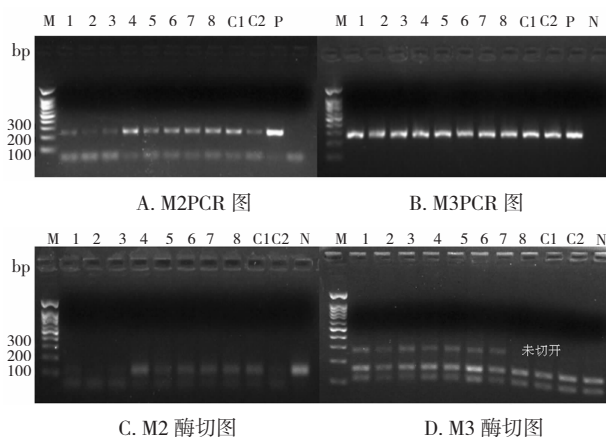


图 1 M1~M3 gRNA 模板 PCR 扩增前后比较

2.3 酶切检测靶位点敲除效果

选择 M2 和 M3 进行注射, 每个样注射 60 个受精卵。取 24~48 hpf 经显微注射 F0 胚胎 8 枚和对照组胚胎 2 枚, 分别提取基因组 DNA, 利用 chopchop 网站设计突变鉴定引物进行 PCR 扩增(表 1)。PCR 扩增结果如图 2A、B 所示。可见除了阴性对照以外, 全部都有条带, 和阳性对照一致。M2 目的条带 232 bp, M3 目的条带 269 bp。

PCR 产物应用特定的内切酶进行酶切, 酶切的结果显示, M3 组的实验组与对照组相比具有未切开条带, 因为靶位点已产生突变, 唯一的内切酶不能将其完全切开, 所以还保留有全长 269 bp 的片段, 说明 M3 组已产生编辑效用, 而 M2 则未见全长 232 bp 的片段, 如图 2C、D 所示。

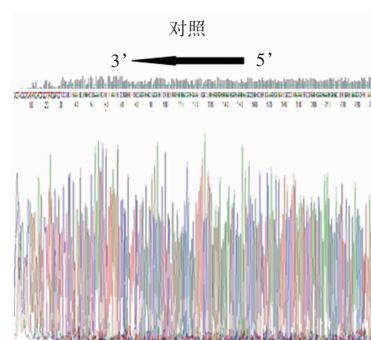


M: DNA marker, 1-8: F0 胚胎, C1-2: 对照组胚胎, P: 阳性对照, N: 阴性对照

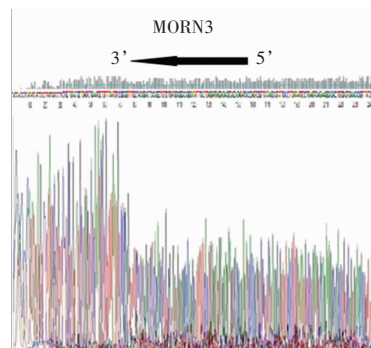
图 2 M2M3PCR 及酶切结果

2.4 测序确认 gRNA 敲除效果

如图 3 所示, M3 对照组在 gRNA 靶位点附近的测序峰图干净的单一峰, 而显微注射组在靶位点附近已出现双峰或套峰。



A. 对照测序图



B. M3 测序图

图 3 M3 测序结果

3 讨论

精子发生是一个精细的细胞发育和分化过程, MEIG1 在调节小鼠精子发生中起重要作用^[9]。为了

探讨 MEIG1 作用的潜在机制,本实验室通过酵母双杂交筛选了与 MEIG1 可能发生蛋白-蛋白间相互作用的基因,结果显示 MORN3 重复出现多次,因此 MORN3 可能是与 MEIG1 相互作用的蛋白。根据本实验室前期研究,小鼠 *Morn3* 基因翻译的约 25 kD 蛋白仅在睾丸中表达,并且该蛋白在出生后 20 d 高度表达。成年野生型小鼠分离的睾丸细胞的免疫荧光染色表明 MORN3 在整个精子发生期间在顶体中表达。在 *Meig1* 敲除小鼠中,MORN3 表达的总量以及在顶体中的定位均没有改变,但是其在 *manchette* 中的表达在 MEIG1 突变小鼠中明显降低,即 MORN3 在 *manchette* 中的定位依赖 MEIG1,鉴于 MEIG1 在精子鞭毛组装中起重要作用,MORN3 可能在 *manchette* 中与 MEIG1 形成复合物,并执行与 MEIG1 类似的功能。因此,MEIG1/MORN3 基因可能是男性不育的新型遗传因素,但是其发生机制很大程度上未知,亟待进一步研究。

CRISPR/Cas9 系统的应用促进了基因编辑技术的快速发展,现已成功地在不同模式生物中实现了高效的基因修饰,包括 DNA 序列的点突变、大片段删除以及外源性基因的定向插入等^[10]。Cas9 的高效性不仅实现在体细胞内对基因进行突变,而且也能同时造成生殖细胞的突变,从而将突变的基因遗传到后代。Schmid 实验室的研究表明,在 Cas9 显微注射的受精卵中,有 11%~43% 能够发育成为 F0,产生稳定的突变品系^[11]。因此,结合斑马鱼幼鱼发育快的特点,可以在短时间内建立稳定可遗传的突变斑马鱼品系,有力推动基因功能的研究。

靶位点的选择和设计是基因编辑过程中首要也是关键的一环,本研究在 gRNA 靶位点的设计中,利用 Labun^[7]和 Montague^[8]等开发的 Chopchop 系统确定待敲除基因的靶位点,该系统简便、易用,仅需要输入基因名称、物种名称、方法名称即可。它采用高效的序列比对算法以缩短搜索时间,并提供了关于敲除效率的一些指标以供选择。对每个可能的靶位点,还匹配合限制性酶切位点和引物可供选择应用,使得后续的工作也变得异常简便。快速和易用使得该系统成为基因工程有价值的工具。

此外,本研究在验证靶点活性的方式上选择了限制性内切酶酶切法,该方法只需将 PCR 产物回收再酶切跑胶即可,虽然只能得到一个粗略的结果,但是简便、快速,成本低廉。酶切可能敲除成功的再

去测序验证,使测序更加有的放矢。需要注意的是在选择靶点时就要确定该靶点有唯一的限制性酶切位点。

本实验通过 CRISPR/Cas9 系统成功获得对斑马鱼 *Morn3* 基因编辑的突变体,为进一步研究其功能打下基础。本实验室接下来将选取已产生有效突变的 F0 代与野生型相交,大量饲养 F1,筛选携带靶位点突变的 F1 成鱼,再将 F1 杂合子相交,筛选出 F2 纯合子进行表型分析,进一步系统地研究 *Morn3* 在精子发生过程中的作用与相关功能。

参 考 文 献

- [1] Tokuhiro K, Hirose M, Miyagawa Y, et al. Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 19039-19048.
- [2] Zhang L, Shang XJ, Li HF, et al. Characterization of membrane occupation and recognition nexus repeat containing 3, meiosis expressed gene 1 binding partner, in mouse male germ cells[J]. Asian Journal of Andrology, 2015, 12: 86-93.
- [3] Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, et al. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(2): 140-147.
- [4] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA, et al. RNA-guided genetic si-lencing systems in bacteria and archaea[J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338.
- [5] LaFave MC, Varshney GK, Vemulapalli M, et al. A defined zebrafish line for high-throughput genetics and genomics: NHGRI-1[J]. Genetics, 2014, 198: 167-170.
- [6] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, 203(3): 253-310.
- [7] Labun K, Montague TG, Gagnon JA, et al. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(W1): 272-276.
- [8] Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): 401-407.
- [9] Zhang Z, Shen X, Gude DR, et al. MEIG1 is essential for spermiogenesis in mice[J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106: 17055-17060.
- [10] Jao L, Wente SR, Chen WB. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system[J]. Pnas, 2013, 110(34): 13904-13909.
- [11] Hruscha A, Krawitz P, Reichenberg A, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish[J]. Development, 2013, 140(24): 4982-4987.

(责任编辑:冉明会)